

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10046

研究課題名（和文）加齢に伴うサーカディアンリズム機能減弱機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of age-related decline in circadian rhythms

研究代表者

中村 渉（Nakamura, Wataru）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授

研究者番号：60372257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：サーカディアンリズムは加齢に伴い、生理機能動態のタイミング分配（同調）機能が低下する。我々は生殖機能の加齢変容において、環境サイクルとサーカディアンリズムとの時間秩序を最適化することにより不妊症を回復しうることを明らかにした。そこで本研究では、様々な生理機能のタイミングを制御する体内時計中枢・視交叉上核について、加齢変容を生じる要因を特定し、環境変化との調和を図る生体時間秩序の維持に破綻をきたす生理基盤を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時計遺伝子欠損マウス7系統について生体レベルでのサーカディアンリズム表出（自由継続）及びノンパラメトリック同調、さらにパラメトリック同調を評価した。これらの研究成果は、体内時計中枢・視交叉上核の加齢変容因子の絞り込みにつながり、神経間リズム同調因子の特定と共に階層的なサーカディアンリズム同調機構の根元的な理解に展開していくことが期待される。これらの研究成果をもとに、体内時計中枢である視交叉上核における加齢に伴うサーカディアンリズム機能減弱を解明し、生体レベルにおける加齢の最適化につなげてゆく。

研究成果の概要（英文）：In circadian rhythm, the timing distribution of physiological dynamics decreases with aging. Previously, we show that infertility can be ameliorated by optimizing the time order between the environmental cycle and circadian rhythm in the age-related changes in reproductive function. In this study, we identify the factors that cause age-related changes in the suprachiasmatic nucleus, which controls the timing of various physiological functions. We clarify the physiological basis that breaks down the maintenance of biological time order in harmony with environmental changes.

研究分野：環境生理学

キーワード：サーカディアンリズム 体内時計 視交叉上核 加齢 睡眠・覚醒リズム

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎える現状の中、高齢者の生活の質を向上し充実した毎日を過ごすためには「昼間は澁刺と活動し、夜間はぐっすりと眠る」環境に調和した生理的タイミングの制御が重要である。サーカディアンリズムの基盤となる体内時計視交叉上核の加齢を理解することは充実した豊かな老後を実現するための社会的ニーズであるといえよう。加齢とともに発症頻度が漸増する、いわゆる「生活習慣病」を克服する最善策は予防であり、大部分の歯科疾患をはじめとする慢性疾患予防には「規則正しい生活」が推奨される。

睡眠・覚醒、自律神経系、(生殖)内分泌系などの生理機能は明瞭な日内変動を示し、関連して歯科疾患には一日の中でハイリスクな時間帯があることが知られている。生体の多様な生理機能のタイミングを制御するのはサーカディアン時計中枢である視床下部・視交叉上核であり、同領域を破壊するとおよそ全ての生理的日内変動は消失する。また、サーカディアンリズムは加齢に伴い、生理機能動態のタイミング分配(同調)機能が低下する。

交叉上核は単一神経細胞内にサーカディアンリズムの最小振動機構を内包しており、時計遺伝子転写の活性化と、翻訳された時計たんぱく質自身が転写活性を抑制する、「ネガティブフィードバックループ」を形成して約 24 時間周期で振動する。視交叉上核は、8,000 個の神経細胞から構成され、その一つ一つが神経発火頻度を出力としてサーカディアンリズムを発信している。それらのサーカディアンリズムには微妙な周期のばらつきがあり、細胞間のリズム共役作用がなければ集合体として頑強なサーカディアンリズムを発信することはできない。研究代表者はこれまでに、加齢に伴い視交叉上核の神経活動リズムが減弱することを見出し、さらに、リズム振幅が減弱する要因としてサーカディアン振動体間のリズム共役が減弱して個々の細胞本来の神経活動期位相が不安定になっていることを明らかにした。しかしこれまでのところ細胞間リズム共役の加齢変化が生理機能を制御する上でどのように作用するかについては明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、加齢による体内時計システムの機能変容を包括的に解明することをねらいとした。様々な生理機能のタイミングを制御する体内時計中枢・視交叉上核について、加齢変容を生じる要因を特定し、環境変化との調和を図る生体時間秩序の維持に破綻をきたす生理基盤を明らかにすると共に、生体レベルにおける加齢の最適化につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

時計遺伝子発現レポーターPER2::LUC マウスを用い、*Cry1^{-/-}*、*Cry2^{-/-}*、*Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}*のサーカディアンリズム表現型を解析した。対照群として C57BL/6J マウスを用いた。動物実験は長崎大学遺伝子組換え実験安全委員会および長崎大学動物実験委員会規則にしたがい、実験計画の承認を受けて実施した。

(2) 輪回し行動リズム測定

野生型、および *Cry1^{-/-}*、*Cry2^{-/-}*、*Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* マウスを対象とし、運動用回転輪を備えた個別ケージにて飼育した。温度、光環境を厳密に制御する環境チャンバー内に安置して、1 分当たりの輪回し回転数を連続的に記録した。1 日当たりの輪回し行動量が安定した後、7 日間は 12 時間明期/12 時間暗期の明暗環境下で測定を行い、その後、恒常暗環境として 15 日間測定を継続した。合計 22 日間の時系列データをもとに、各遺伝型における輪回し行動の開始位相、終了位相、自由継続周期を評価した。

(3) 下垂体における PER2 発現イメージング

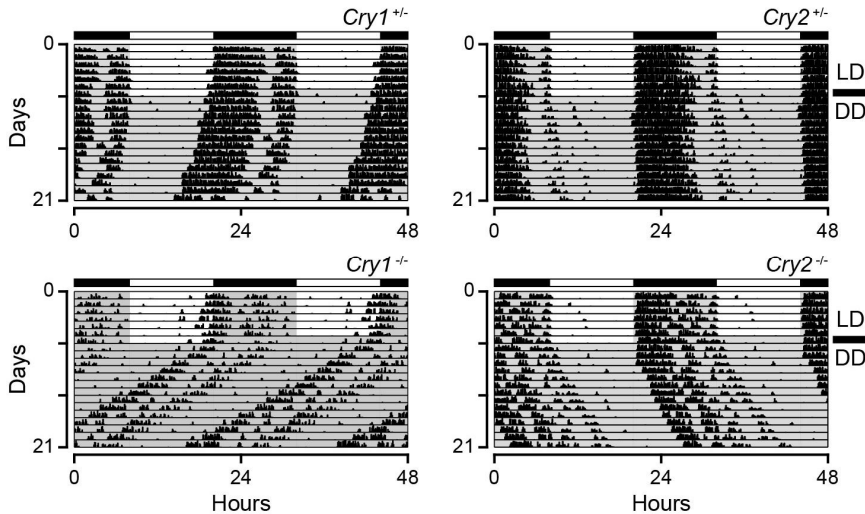
時計遺伝子発現レポーターPER2::LUC マウスを用い、体内時計中枢である視床下部視交叉上核および、下垂体における生物発光イメージングを行った。遺伝子改変レポーターマウスより、脳組織および下垂体組織を摘出し、発光基質ルシフェリンを含む培養液中で期間培養を行った。レポーターマウスのルシフェラーゼ活性は PER2 発現量を反映しており、生物発光イメージングにより時間的タンパク質発現変動とともに、空間的発現部位の特定を試みた。

(4) 視交叉上核および下垂体における PER2 発現リズム

時計遺伝子発現レポーターPER2::LUC マウスを応用し、体内時計中枢・視床下部視交叉上核および、末梢時計・下垂体における生物発光リズムの計測を行った。光電子増倍管を用いた微量生物発光の連続記録により、野生型、および *Cry1^{-/-}*、*Cry2^{-/-}*、*Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}* マウス各遺伝型組織レベルでのサーカディアンリズム特性を評価した。

4. 研究成果

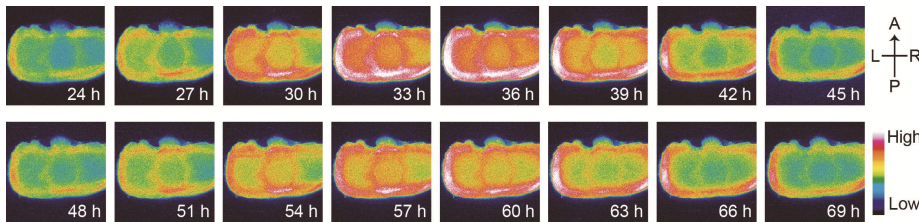
(1) *Cry1^{+/-}*, *Cry1^{-/-}*, *Cry2^{+/-}*, *Cry2^{-/-}*マウスの輪回し行動リズム



輪回し行動測定開始後7日間の12時間明期/12時間暗期明暗環境下において、野生型、*Cry1^{+/-}*, *Cry2^{+/-}*, *Cry2^{-/-}*マウスが消灯と同時に活動開始する輪回し行動リズムを示したのに対して、*Cry1^{-/-}*マウスは行動開始、終了ともに約1時間の位相前進が認められた。行動位相の設定には環境光サイクル

に対する位相反応性と、生体行動リズムの自由継続周期が影響するため、各遺伝型マウスの恒常暗環境における自由継続周期を計測した。結果として、野生型 (23.73 ± 0.05 時間) *Cry1^{+/-}*マウス (23.65 ± 0.07 時間) の遺伝型間で自由継続周期に差がみられないのに対し、*Cry1^{-/-}*マウスでは有意な周期の短縮 (22.17 ± 0.08 時間) がみとめられた。一方、*Cry2*欠損マウスでは、*Cry2^{-/-}*マウスの自由継続周期に有意な延長 (24.06 ± 0.05 時間) がみられ、*Cry2^{-/-}*マウスでは更に延長 (24.53 ± 0.07 時間) がみとめられた。

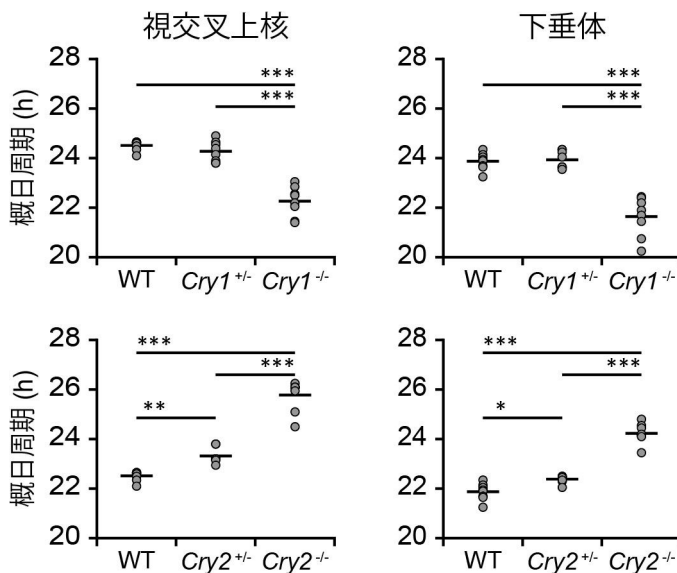
(2) 下垂体における PER2 発現イメージング



生体から摘出して器官培養を行った下垂体組織において、PER2::LUC発現は数週間継続する安定したサーカディアンリズムをしめした。

PER2::LUC発現は下垂体全体にみられ、特にげっ歯類に特徴的な構造である下垂体中葉および、下垂体前葉(腺下垂体)辺縁部に強い発現がみとめられた。

(3) 視交叉上核および下垂体における PER2 発現サーカディアンリズム



光電子増倍管を用いた微量生物発光の連続記録により、体内時計中枢・視床下部視交叉上核および、末梢時計・下垂体における生物発光リズムの計測を行った。野生型、および *Cry1^{+/-}*, *Cry1^{-/-}*, *Cry2^{+/-}*, *Cry2^{-/-}*マウス各遺伝型組織レベルでのサーカディアンリズム特性を評価した。

視交叉上核において、野生型 (24.51 ± 0.07 時間) *Cry1^{+/-}*マウス (24.27 ± 0.14 時間) の遺伝型間でリズム周期に差がみられないのに対し、*Cry1^{-/-}*マウスでは有意な周期の短縮 (22.26 ± 0.21 時間) がみとめられた。一方、*Cry2*欠損マウスでは、*Cry2^{-/-}*マウス視交叉上核のリズム周期に有意な延長 (25.31 ± 0.11 時間) がみられ、*Cry2^{-/-}*マウスでは更なる延長 (27.78 ± 0.22 時間) がみとめられた。下垂体組織におけるサーカディアンリズム周期についても同様の遺伝型特性をしめした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohara Takayuki, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru, Tokuda Isao T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Modeling circadian regulation of ovulation timing: age-related disruption of estrous cyclicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73669-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Vu Chi Hoang Viet, Kawashima Motoko, Nakamura Wataru, Nakamura Takahiro J., Tsubota Kazuo	4. 巻 206
2. 論文標題 Circadian clock regulates tear secretion in the lacrimal gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108524 ~ 108524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2021.108524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto A, Fujiki S, Nakamura W, Nakamura TJ.	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of testosterone on circadian rhythmicity in old mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 791-798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-019-00695-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 中村 渉, 高須 奈々	4. 巻 24
2. 論文標題 生体リズムを制御する体内時計機構 ~From the Discovery to Innovations~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 26-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Yoshiaki, Takasu Nana N., Ohno Sachi N., Shirakawa Yukie, Sugimura Mitsutaka, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru	4. 巻 772
2. 論文標題 Role of heterozygous and homozygous alleles in cryptochrome-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136415 ~ 136415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.136415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Shota, Tahara Yu, Colwell Christopher S., Block Gene D., Nakamura Wataru, Nakamura Takahiro J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Chronic methamphetamine uncovers a circadian rhythm in multiple-unit neural activity in the dorsal striatum which is independent of the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms	6. 最初と最後の頁 100070 ~ 100070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbscr.2021.100070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Niino Ayako, Ohno Sachi N., Yamagata Kanae A., Yamagata Kazuaki, Tomita Kazuo, Kuramoto Eriko, Oda Yoshiaki, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru, Sugimura Mitsutaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Diurnal Variation in Trigeminal Pain Sensitivity in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 703440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.703440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村 渉, 中村 孝博
2. 発表標題 マウスの社会的時差ぼけモデルにおける妊孕性障害機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 渉
2. 発表標題 食行動のサーカディアン制御と加齢変容
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 渉
2. 発表標題 生体リズムを制御する体内時計機構
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 渉
2. 発表標題 体内時計とサーカディアンリズム
3. 学会等名 第87回日本口腔外科学会九州支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 渉，中村孝博，高須奈々
2. 発表標題 体内時計が制御する睡眠覚醒リズムと加齢に伴う機能低下
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 渉
2. 発表標題 サーカディアンリズムと性周期の相互作用
3. 学会等名 第5回幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 渉, 中村 孝博, 織田 善晃, 高須 奈々
2. 発表標題 サーカディアンリズム同調と性周期
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高須 奈々 (Takasu Nana) (60372257)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特任研究員 (17301)	
研究協力者	中村 孝博 (Nakamura Takahiro) (00581985)	明治大学・農学部・専任准教授 (32682)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	カリフォルニア大学ロサンゼルス校			